

2005011006A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

生体の作用点、特に核内受容体及び関連転写因子群
に着目した化学物質の
毒性発現機構の解明や毒性予測手法の開発を行う研究
(H17-化学-007)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高木 篤也

平成 18(2006)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

生体の作用点、特に核内受容体及び関連転写因子群に着目した化学物質の毒性
発現機構の解明や毒性予測手法の開発を行う研究(H17-化学-007)

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 高木 篤也

平成 18(2006)年 3 月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

研究の総括及び、内分泌かく乱化学物質等核内受容体作用化学物質(以下、核内受容体作用物質)のハイスループット・スクリーニングの実施、及び、高速分析系の比較解析と遺伝子発現スクリーニング系の開発 1

高木 篤也

II. 分担研究報告書

1. 核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発 149

小野 敦

2. 受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究 157

小原 有弘

3. 核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究 163

板井 昭子

4. 超高速分析法の検証と評価に関する調査研究 179

菅野 純

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 183

IV. 研究成果の刊行物・別刷 185

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

生体の作用点、特に核内受容体及び関連転写因子群に着目した化学物質の
毒性発現機構の解明や毒性予測手法の開発を行う研究

主任研究者 高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部室長

研究要旨

本研究では、当該研究課題に先立つ研究結果をもとに厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会、中間報告書追補」に於いて提案された「試験スキーム」に沿って要求される内分泌かく乱化学物質大規模スクリーニングを実施するとともに、これまでの研究結果をもとに内分泌かく乱化学物質の標的分子である核内受容体作用について、化学物質と受容体、応答 DNA 配列及び転写に関わる共役因子との相互作用、更には受容体制御下にある遺伝子発現への影響について解析を行い、得られた結果をこれまで開発を進めてきた細胞系スクリーニング法や *in silico* 手法へフィードバックし、分子標的作用メカニズムに基づく見落としのないスクリーニング系とするとともに、科学的に、より高度なメカニズム解析による次世代評価系への応用を目的としている。本年度は、(1)内分泌かく乱化学物質等核内受容体作用化学物質のハイスループット・スクリーニングの実施に於いては、ER α 、ER β 系について *in silico* 計算により活性が予測された化合物を中心に各 71 物質についての測定を、AR 及び TR 系については、それぞれ 50 物質について測定を実施した。*In silico* スクリーニング系については、ER α 、ER β について今後の一貫した解析に用いるための結合強度予測式及び計算条件を確定し、20000 化合物についての再計算と計算未実施であった化合物についての追加計算を行った。また、ER レポーター遺伝子測定系及び *in silico* スクリーニング系については OECD バリデーションへの提案を行った。(2)核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発では、SPR バイオセンサーを用いた核内受容体相互解析系の拡張により、化合物特異的な受容体-共役因子間の相互作用変化と生体作用との関連解析に向けた化合物測定を進めるとともに、相互作用をより網羅的に解析する手法の検討を行った。(3)受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲット臓器に由来する細胞株を選択し、47 種の核内受容体遺伝子に関して定量的な結果を得た。(4)核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究では、3 種の核内受容体(ER、AR、TR)特異的リガンドを投与したマウス肝臓遺伝子発現データから各ホルモン作用に対して有意に発現亢進または低下した分子を端点とした分子ネットワークの生成を行った。

A. 研究目的

多くの化学物質が生物の内分泌系をかく乱し、野生生物及びヒトの健康に影響を及ぼすことが懸念されている。その一方、我々の現代生活に於いては膨大な種類の化学物質が利用されているため、これらの化学物質の生体影響

について早急に調査する必要がある。このため、各国で提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無をスクリーニングする手法の有効性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良及び新規スクリーニング系の開発を行うための研究を平成10年度からスタートし、これ

までに信頼できる系を構築するとともにトータルで約 500 化合物についての測定を行い、詳細試験実施のための優先順位付けのためのスキームの構築を進めてきた。更に、内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を原子レベルで理論的に解析する *in silico* ドッキングモデルを確立し、超高速スクリーニング法を開発した。これに合わせ、新規スクリーニング手法として表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)によるホルモン受容体に対する結合・解離等に関するデータの高速取得技術の開発を行い、*in vitro* に於ける受容体と結合物質との相互作用情報から、受容体に於けるアゴニスト効果/アンタゴニスト効果(阻害)の予測や、共役因子との相互作用解析から化合物を分類可能であることが示され、化学物質ごとに特異の生体反応や臓器特異性がその作用ターゲットである受容体と他の細胞内因子との相互作用解析から検出可能であることを示した。本研究では、内分泌かく乱化学物質問題の解決に向けて厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会、中間報告書追補」に於ける「試験スキーム」に則った大規模スクリーニングを実施すると共に、内分泌かく乱化学物質の標的分子である核内受容体について、標的分子及び転写に関わる共役因子との相互作用への影響や受容体制御下にある遺伝子発現への影響を解析し、得られた結果をこれまでに開発してきた HTPS や QSAR ヘフィードバックすることにより、生物システムに於ける反応を迅速に評価するための技術として確立することにより内分泌かく乱性を始めとした化学物質の生体作用評価やメカニズム研究への有効応用を目的としている。

本年度は、(1) 内分泌かく乱化学物質等核内受容体作用化学物質のハイスループット・スクリーニングの実施に於いては、ER α 、ER β

系について *in silico* 計算により活性が予測された化合物を中心に各 71 物質についての測定を、AR 及び TR 系については、それぞれ 50 物質についての測定を実施した。*In silico* スクリーニング系については、ER α 、ER β について今後の一貫した解析に用いるための結合強度予測式及び計算条件を確定し、20000 化合物についての再計算と計算未実施であった化合物についての追加計算を行った。また、ER レポーター遺伝子測定系及び *in silico* スクリーニング系については OECD バリデーションへの提案を行った。(2) 核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発では、SPR バイオセンサーを用いた核内受容体相互解析系の拡張により、化合物特異的な受容体-共役因子間の相互作用変化と生体作用との関連解析に向けた化合物測定を進めるとともに、相互作用をより網羅的に解析する手法の検討を行った。(3) 受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲット臓器に由来する細胞株を選択し、47 種の核内受容体遺伝子に関して定量的な結果を得た。(4) 核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究では、3 種の核内受容体(ER、AR、TR) 特異的リガンドを投与したマウス肝臓遺伝子発現データから各ホルモン作用に対して有意に発現亢進または低下した分子を端点とした分子ネットワークの生成を行った。

B. 研究方法及び、C. 研究結果

(1) 内分泌かく乱化学物質等核内受容体作用化学物質(以下、核内受容体作用物質)のハイスループット・スクリーニングの実施(主任研究者: 高木篤也、分担研究者: 菅野純、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)

研究目的：本研究では、これに先立つ研究結果をもとに厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会、中間報告書追補」に於いて提案された「試験スキーム」に沿って要求される内分泌かく乱化学物質スクリーニング手法の検証のため、既存化学物質についてそれぞれの系に於ける大規模スクリーニングを実施し、得られた結果から化合物の内分泌かく乱性についての検討と各系の結果の比較検討を行うことを目的としている。本年度は、ER α / β 系については *in silico* 計算により活性が予測された化合物を中心に各 71物質についての測定を行い ER α / β サブタイプに対する応答性について解析した。また、AR 及び TR 系については、それぞれ 50 物質についての測定を実施した。一方、*in silico* スクリーニング系に於いては、これまでに構築した ER α 、ER β ドッキングモデルを用いた予測評価のための追加計算を実施した。また、ER レポーター遺伝子測定系及び *in silico* スクリーニング系については、これまでの結果をもとに OECD バリデーションへの提案を行った。

(1)-1. エストロゲン受容体 α / β サブタイプに対する応答性に関する研究（主任研究者：(財)化学物質評価研究機構委託業務）

研究目的：近年、化学物質の持つ有害作用の中で動物の生殖機能に影響を与えることが懸念される毒性影響、いわゆる内分泌かく乱化学物質 (EDs) 問題が注目を集めている。化学物質の内分泌攪乱作用を評価するための毒性試験法は未だ確立されておらず、現在、OECD などの国際機関を中心に EDs スクリーニング法の開発・評価プロジェクトが展開されている。米国では環境保護庁 (EPA) の諮問機関として 1996 年に設置された Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory

Committee (EDSTAC) では現在使用されている化学物質の内分泌攪乱能力を評価するためのフロースキームを提案し、ポリマー及び年間生産量が 10000 ポンドを下回る化学物質を除く約 15000 種の化学物質について High Throughput Prescreening (HTPS) を行い、内分泌攪乱作用について優先順位を付けた上で齧歯類子宮増殖試験、Hershberger 試験等の高次 Screening 試験へ移行し化学物質の持つ内分泌攪乱作用を明らかにしていく方針を示した。本研究では Firefly Luciferase 遺伝子上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid とヒトエストロゲンレセプター (ER) α 又は β サブタイプ蛋白を常時発現するためのレセプター発現 Plasmid が同時に一過性に導入されたヒト由来の細胞 (HeLa cell) を使用し、化学物質のホルモン様活性の高速スクリーニング試験法の開発及びその検証を目的として、本年度は 71 物質の測定を実施した。

研究方法：

2.1 供試化学物質

Table 1 に示した。

2.2 試薬の調製

1) 化合物原液の調製

各化合物を秤量した後、10mM となるように Dimethyl sulfoxide (DMSO、ナカライテスク) もしくは水を加えて溶解した。10mM に調製した化合物は DMSO にて 1/10 希釈を行い 1mM、100 μ M、10 μ M、1 μ M、100nM、10nM 及び 1nM とした。化合物は終濃度が 10 μ M、1 μ M、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM 及び 1pM となるように EMEM-10%FBS 培地に添加した。

2) 細胞

ヒト子宮頸ガン由来細胞株 HeLa (ATCC No.

CCL-2.1)を ATCC より購入し使用した。

3) プラスミド

i) 女性ホルモンレセプター(ER)発現プラスミド
当機構にてクローニングしたヒト ER alpha coding cDNA 全長(Genbank Accession No. M12674)及びヒト ER beta coding cDNA 全長(Genbank Accession No. AB006590)を哺乳動物細胞用発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen) に導入し作製した hER α /pcDNA3.1 及び hER β /pcDNA3.1 (図 1)を使用した。

ii) レポータープラスミド

当機構にてクローニングした Rat alpha2u-globulin (AUG)遺伝子のプロモーター配列の一部を pGL3 basic vector (Promega)のマルチクローニングサイトに導入し、更にアフリカツメガエル Vitellogenin 由来のエストロゲン応答配列(ERE)の 3 回連続繰り返しからなる合成オリゴヌクレオチドをプロモーター配列の上流に組み込み作製した ERE-AUG-Luc+ (図 1)を使用した。

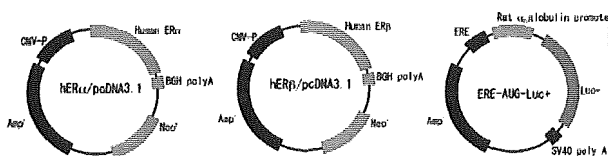


図 1 本研究に用いた受容体発現プラスミド及びレポータープラスミド

3) EMEM-10%FBS 培地

粉末培地(イーグル MEM ニュスイ) 4.7g、10%炭酸水素ナトリウム(10g→100mL) 9mL 及び 3% L-グルタミン(3g→100mL) 6mL に精製水を加えて 500mL とした(EMEM 基礎培地)後、Dextran coated charcoal(DCC)処理した牛胎児血清(FBS) 56mL を加え、ろ過滅菌した。

4) 細胞溶解剤

5x Cell Culture Lysis Reagent (CCLR、プロメガ株式会社) 10mL に精製水を加えて 45mL とした。

5) Luciferase Assay Reagent の調製

Luciferase Assay Substrate (プロメガ株式会社)の容器に Luciferase Assay buffer 105 mL 全量を直接加えて溶解した。

2.3 ER alpha 及び ER beta agonist 検出系

2.3.1 Assay プレート上のサンプル配列

以下の plate format に従い、自動試薬分注装置(Biomek 2000、Beckmann-Coulter 株式会社)を用いて化学物質の添加を行った。

* 被験物質及び陽性対照物質は、下図の配置例に従って Microplate の各 well に添加する。

	化合物1			化合物2			化合物3			化合物4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	100 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	10 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	1 nM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	100 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	10 pM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	NC	-	-	-	-	-	PC	-	-	-	-	-

NC: Negative control (DMSO), PC: Positive control (E2)

2.3.2 測定の手順

以下の手順に従って測定を行った。

↓細胞を測定用の 96well プレートに播種 (104/50 μ L/well)

↓培養一晚(12時間以上)

↓ Transfection 液調製

FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied

Science) 20 μ L

発現 Plasmid 2 μ g, レポーターPlasmid 8 μ g

無血清培地 580 μ L

↓ 15 分間静置

↓ total 1 mL になるよう無血清培地添加

↓ 各 well に 50 μ L ずつ添加

↓インキュベータ内 2 時間静置
 ↓化合物の添加(終濃度 1 μ M,100nM,10nM,1nM, 100pM,10pM,1pM 及び DMSO 各 n=3 又は n=6)*
 ↓CO₂ インキュベータ内で培養(20-24 時間)
 ↓培地の除去及び PBS による洗浄 (100 μ L \times 2 回)
 ↓細胞溶解剤の添加(15 μ L/well)
 ↓10 分間室温で静置
 ↓ルミノメータによる発光測定
 注入量 : 50 μ L/well
 測定時間: 注入 1 秒後~5 秒間(100 msec \times 50 interval)の積算

2.3.3 結果の解析:

被験物質及び陽性対照物質の全濃度区で得られた発光強度 (RLU) から陰性対照区の平均値で差し引いた後、陽性対照区の平均値 (通常、誘導活性がプラトーに達する 1 nM E2 を使用) で除し、相対転写活性化倍率 (Relative transcriptional activity) を求めた。また、各濃度区で得られた発光強度 (RLU) を陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率 (Transcriptional activity, Fold induced) を求めた後、図 2 で定義される陽性対照区の最大転写活性化倍率 (通常 1 nM E2) の 10% の値を与える濃度 (PC10) 及び 50% の値を与える濃度 (PC50) を、2 濃度区間を結ぶ一次回帰式より求めた。

PC10 が算出されない化合物はエストロゲン活性陰性 (-) と判定した。

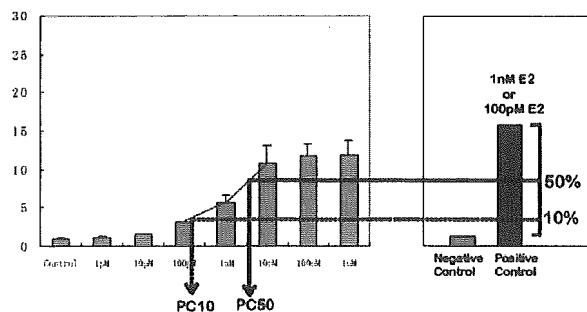


図 2 DATA 処理法模式図(PC10、50 の定義)

研究結果:

ER alpha 及び ER beta agonist 検出系

結果は Table 2 に示した。またアゴニスト活性を有する物質を以下に示した。

71 物質について本実験系にて ER alpha 及び ER beta アゴニスト活性のスクリーニングを実施した結果、PC10 が検出された物質は、ER alpha のみについて 7 物質、ER beta のみについて 1 物質であり、両者共に PC10 が検出された物質は 8 物質であった。この 8 物質中では ER alpha に選択性の高いもの(5倍以上濃度差のあるもの)はなく、ER beta に選択性の高いものは 2 物質、同等のものは 6 物質であった。比較的強いアゴニスト活性(PC50)を有する物質は ER alpha のみについてはなく、ER beta のみについて 1 物質、両者共に有する物質は、3 物質であった。

Table.2 ER alpha 及び ER beta agonist 検出系測定結果

HTS No.	Chemical Name	ER alpha	ER beta	ER alpha/ER beta
HTS2001	ER2001	1.0	1.0	1.0
HTS2002	ER2002	1.0	1.0	1.0
HTS2003	ER2003	1.0	1.0	1.0
HTS2004	ER2004	1.0	1.0	1.0
HTS2005	ER2005	1.0	1.0	1.0
HTS2006	ER2006	1.0	1.0	1.0
HTS2007	ER2007	1.0	1.0	1.0
HTS2008	ER2008	1.0	1.0	1.0
HTS2009	ER2009	1.0	1.0	1.0
HTS2010	ER2010	1.0	1.0	1.0
HTS2011	ER2011	1.0	1.0	1.0
HTS2012	ER2012	1.0	1.0	1.0
HTS2013	ER2013	1.0	1.0	1.0
HTS2014	ER2014	1.0	1.0	1.0
HTS2015	ER2015	1.0	1.0	1.0
HTS2016	ER2016	1.0	1.0	1.0
HTS2017	ER2017	1.0	1.0	1.0
HTS2018	ER2018	1.0	1.0	1.0
HTS2019	ER2019	1.0	1.0	1.0
HTS2020	ER2020	1.0	1.0	1.0
HTS2021	ER2021	1.0	1.0	1.0
HTS2022	ER2022	1.0	1.0	1.0
HTS2023	ER2023	1.0	1.0	1.0
HTS2024	ER2024	1.0	1.0	1.0
HTS2025	ER2025	1.0	1.0	1.0
HTS2026	ER2026	1.0	1.0	1.0
HTS2027	ER2027	1.0	1.0	1.0
HTS2028	ER2028	1.0	1.0	1.0
HTS2029	ER2029	1.0	1.0	1.0
HTS2030	ER2030	1.0	1.0	1.0
HTS2031	ER2031	1.0	1.0	1.0
HTS2032	ER2032	1.0	1.0	1.0
HTS2033	ER2033	1.0	1.0	1.0
HTS2034	ER2034	1.0	1.0	1.0
HTS2035	ER2035	1.0	1.0	1.0
HTS2036	ER2036	1.0	1.0	1.0
HTS2037	ER2037	1.0	1.0	1.0
HTS2038	ER2038	1.0	1.0	1.0
HTS2039	ER2039	1.0	1.0	1.0
HTS2040	ER2040	1.0	1.0	1.0
HTS2041	ER2041	1.0	1.0	1.0
HTS2042	ER2042	1.0	1.0	1.0
HTS2043	ER2043	1.0	1.0	1.0
HTS2044	ER2044	1.0	1.0	1.0
HTS2045	ER2045	1.0	1.0	1.0
HTS2046	ER2046	1.0	1.0	1.0
HTS2047	ER2047	1.0	1.0	1.0
HTS2048	ER2048	1.0	1.0	1.0
HTS2049	ER2049	1.0	1.0	1.0
HTS2050	ER2050	1.0	1.0	1.0

(1)-2. アンドロゲン、甲状腺受容体レポーター遺伝子細胞系を用いた高速自動分析系に関する研究 (主任研究者:大塚製薬ライフサイエンス事業部EDC分析センター委託業務)

研究目的: 本研究では、これまでに構築した性ホルモン受容体の一つであるアンドロゲン受容体(AR)と甲状腺ホルモン受容体(TR)についてルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとした AR レポータージーンアッセイ及び TR レポータージーンアッセイを用いてそれぞれ 50 化合物についてアゴニスト活性、アンタゴニスト活性を測定し、化合物の持つ特性についての知見を得ることを目的とした。

研究方法:

1. AR レポータージーンアッセイ

AR-EcoScreen™ 細胞を 1×10^5 cell/mL の濃度に調製し、96 ウェルプレートに $90 \mu\text{L}/\text{well}$ で撒いた。このときの培養液は Phenol Red Free D-MEM/F12 (GibcoBRL), 5% Charcoal / Dextran treated FBS (Hyclone) を用いた。翌日(約 20 時間後) サンプル及び標準物質をプレートフォーマットにしたがって各ウェルに $10 \mu\text{L}$ 加え CO_2 インキュベータでさらに培養した(約 20 時間)。翌日、ルシフェリン溶液(Steady-Glo™: Promega)を加えて約 5 分間振とう混和して細胞を溶解し、ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。AR アンタゴニストアッセイには、細胞を培養している培養液の終濃度が 5×10^{-10} M となるように添加する被験物質にあらかじめ DHT を加えておき、その活性がどの程度阻害されるかでアンタゴニスト活性を評価した。サンプル調製プレートから AR-EcoScreen™ 細胞に各ウェル $10 \mu\text{L}$ 加え CO_2 インキュベータでさらに培養した(約 20 時間)。翌日、蛍光ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液(Dual-Glo™: Promega)をマニュアルにしたがって加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。

発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

2. TR レポータージーンアッセイ

CHO-K1 細胞を 1×10^5 cells/ml の濃度に調製し、96 ウェルプレートに $84 \mu\text{L}/\text{well}$ で播種する。このときの培養メディウムは Phenol Red Free D-MEM/F12(GibcoBRL), 5%Charcoal Dextran treated FCS(Hyclone)を用いる。翌日、TR アゴニストアッセイにはプレート 1 枚あたり、pTRb-RXR 62ng、pIND-TRE-DR4 62ng を希釈トランスフェクション試薬(FuGene6 (ロッシュ) 18.6ml を Medium(血清無添加) 620ml で希釈したもの)に加え 96 ウェルプレート各列にマルチチャンネルピペットで 6ml ずつ添加し、 CO_2 インキュベータで培養する。TR アンタゴニストアッセイには pTRb-RXR 62ng、pIND-TRE-DR4 $31 \mu\text{g}$ 、phRLTK $31 \mu\text{g}$ のプラスミド Mix を同様に用いる。培養3時間後にサンプル及、標準物質及び各コントロール物質をプレートフォーマットにしたがって各ウェル $10 \mu\text{L}$ 加え CO_2 インキュベータでさらに培養する。アンタゴニストアッセイの際に終濃度が 1×10^{-8} M (この濃度は最大活性の約 20%に相当)になるように T3 を加えておき、その T3 の活性をどの程度阻害するかで対象サンプルの TR アンタゴニスト活性を評価した。翌日、蛍光ルシフェリン及びウミシイタケルシフェリン基質溶液(アゴニストアッセイは Steady-Glo™, アンタゴニストアッセイは Dual-Glo™: Promega)をマニュアルにしたがって加えて約 10 分間振とう混和して細胞を溶解し、各ルシフェラーゼ誘導活性を発光強度として測定した。蛍光及び発光測定は ARVO.sx multilabel counter (Wallac Berthold) を用いた。

研究結果:

1. AR アゴニスト活性

これまでの検討から、PC10 が算出できるサンプルは AR アゴニストとして有意な転写活性があると結論してよいと考えられた。よって本年度の検討においても、PC10 が算出できる物質をARアゴニストとして定義することとした。本年度測定対象とした 50 物質について、PC10 を算出することができた AR アゴニスト活性物質について、その結果より、1,3-Benzenediamine, 4,4'-(4-methyl-1,3-phenylene) (AT101) (PC10 = 3.96×10^{-8})及び Pyrophosphoric acid, tetrapotassium salt (AT105)(PC10 = 1.96×10^{-6})が非常に弱いアゴニストとして検出された。

2. AR アンタゴニスト活性

AR アッセイのアンタゴニスト活性検出についてもこれまでの検討により、IC20 が算出できれば有意なアンタゴニスト活性が検出されたと判断できるが、細胞毒性が 15%から 20%以上検出された場合は、その被検物質をレセプターアンタゴニストとしての判断するのは注意が必要であるとしている。本年度測定対象とした 50 物質について、IC20 以上を算出することができたARアンタゴニスト活性物質は 10 物質あった。その結果を表2に示す。またその化学構造を図2に示す。非常に強いアンタゴニスト作用があったのは、既に AR アンタゴニスト作用が報告されているベンジジンの誘導体である 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-Benzidine であった。またアンタゴニストが比較的強い化合物には、農薬である Pyrethrins、PROCHLORAZ などがあった。

3. TR アゴニスト活性

T3 活性の 10%以上の TR アゴニスト活性を示したものは、50 化合物中 2 化合物であった。

AT105 は pyrophosphoric acid であり、AT126 は 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro

-benzidine である。さらに、これらの化合物が TRb, RXR, 内在性の因子のいずれに反応しているかを調べるために、TRb, RXR それぞれの単独発現系及び受容体非存在下の系でこの2つの化合物の反応性測定を行った結果、AT105 は受容体が非存在下でもベースラインから3倍程度の反応性を示したことから、AT105 は、TRb ではなく細胞内在性の何らかの因子に反応していることが明らかとなった。一方、AT126 に関しても、受容体非存在下の系に於いてベースラインから 3 倍程度の活性が見られたので、こちらも細胞内在性の何らかの因子に反応していることがわかった。しかしながら、AT126 の場合、TRb と RXR の共発現系ではそれ以上(ベースラインから 5.8 倍)の反応性が確認されたことから、この化合物は内在性因子以外に、TRb と RXR のヘテロダイマーに特異的に反応性を示すことが示唆された。

4. TR アンタゴニスト活性

本年度 50 化合物の TR アンタゴニスト活性測定の結果、細胞毒性のために活性が下がった化合物はあった(AT103、AT104、AT109、AT111、AT120、AT121、TR141、TR144、TR149)ものの明確にアンタゴニスト活性を示した化合物は認められなかった。

(1)-3. 核内受容体ドッキングモデルによる *in silico* スクリーニング系の研究(主任研究者:医薬分子設計研究所委託業務)

研究目的: 近年、環境中に存在する多くの天然または化学合成された物質が内分泌かく乱作用を示して、生物体の健全な発育を阻害することが明らかになり、その科学的な確認と対策が急務となっている。これらの化学物質は女性ホルモン受容体等の核内受容体に結合す

るためにそうした作用を発現すると推定されており、同定・検出のための試験方法についての研究と、個々の既知内分泌かく乱化学物質がどのように生物作用を発現するかを明らかにするための研究が数多くなされている。

一方、女性ホルモン受容体等核内受容体のリガンド結合ドメインは結晶構造解析されており、標的受容体の立体構造情報に基づくコンピュータを用いた理論的なアプローチが可能である。当研究者らは以前から標的受容体の立体構造が利用できる場合に、受容体-リガンド間で形成され得る水素結合を足がかりとして任意の化合物が形成できる最安定な複合体の構造を予測し、原子レベルでの相互作用様式と結合の強さを推定する自動ドッキング法の方法論を確立してきた。またその方法に基づいて新規の活性化化合物を探索する目的で、膨大な数の化合物から標的受容体に安定に結合する可能性の高い少数の化合物を選別する三次元データベース検索法の開発を行ってきた。すなわちこの方法によれば、あらかじめ設定した蛋白質結合キャビティ内の水素結合部位や芳香族環などの相互作用部位と、対象データベース中の低分子化合物の水素結合部位や芳香族環などとのマッチングを、低分子化合物内の回転可能な結合を系統的に回転させてコンフォメーションを変えることで網羅的に実行することができ、最良の蛋白質-低分子リガンド相互作用様式(結合様式)を見つけることができる。またこの三次元データベース検索法の開発に併せて、低分子化合物の二次元構造情報(化学構造式)から、原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造を得るためのモデリングツールの開発も進めてきた。さらに近年当研究者らは、蛋白質とリガンドの複合体構造が得られた場合に、分子力場を用いて受容体-低分子リガンド複合体のエネルギー極小化計算及びエネルギー解析(結合自由エネルギー計算)を行う方法を確立してきた。本研究は、この低分子化合物三次元化法ならびに三次元データベース検索法、さらに複合体エネルギー極小化計算法及

び結合自由エネルギー解析法を応用して、内分泌かく乱作用未知の膨大な数の化学物質について、標的受容体に対する結合様式と、結合自由エネルギー値から導き出される相対結合能を推算することを目的とする。

研究方法: 今後の一貫した研究に利用する目的で、ER α 、ER β に対する結合強度予測式は、平成15年度に構築した式と係数に確定することにした。計算条件は、平成16年度の条件に準じるものとした。それらを用いて、過去に活性予測を行なったが現状では異なる結果が予想される物質及び新規な追加物質の計133化合物について、ER α 及びER β に対する結合様式の推定と17 β -エストラジオールに対する相対結合強度(RBA値)の予測を実施した。また、ER α に対しては、米国EPAが環境ホルモン物質スクリーニング候補化合物として提示している約58,000化学物質の中から、正確な化学構造式が入手でき、且つ実際の活性確認のための生化学的試験を実施し得る(すなわち入手可能な)約20,000化合物についても、結合様式の推定と結合強度予測を再実施した。

1. ドッキングに使用する受容体立体構造の準備

ドッキング計算に使用するER α の立体構造は、Protein Data Bank(PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型ER α のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ハイドロキシタモキシフェンが結合している3ert.pdbを使用した。また、ER β については、アンタゴニスト結合型ER β のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ICI164384が結合している結晶構造である1hjl.pdbを使用した。PDB中の蛋白質座標に水素を付加し、蛋白質分子力場計算プログラムAMBERで水素構造の最適化を行った後、AMBER原子タイプ・原子電荷の割り振りを行

った。さらに自動ドッキングプログラムを実行する際に必要な水素結合情報を割り振った。

2. ドッキングに使用する低分子立体構造の準備

ER α 及び ER β に対する結合強度予測計算に使用する低分子物質として、まず、過去に活性予測を行なったが現状では異なる結果が予想される物質及び新規な追加物質の計 133 化合物を対象とした。更に、ER α に対しては、米国 EPA が環境ホルモン物質スクリーニング候補化合物として提示している 58,591 の化学物質を対象とした。検討に先立って、EPA から提供されたデータベース中の化学構造式をチェックしたところ、明らかな構造式の誤りや立体構造の記載不備が目立った。当該コンピュータスクリーニング計算に於いては化学物質の立体構造情報が非常に重要であり、間違った情報を使用した計算はまったく意味を持たないことから、EPA 作成データベースに比較して完成度が高いと考えられる市販化合物データベース (Available Chemicals Directory) を利用してデータの補完を行った。その結果、EPA 提示化学物質のうち 19,667 化学物質について、市販化合物データベースから立体構造情報を含む化学構造式が入手可能であった。これらの構造を低分子化合物三次元化プログラム Key3D (旧称 Olive) により、原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造に変換した。さらに自動ドッキングプログラム ADAM を実行するために必要な水素結合情報、コンフォメーション探索時の結合回転情報や芳香族環の位置情報を付加した。

3. ER α 及び ER β と各低分子化合物のドッキング計算

蛋白質-リガンド自動ドッキングプログラム ADAM を用いて各化学物質の複合体構造を推定した。続いて、複合体が得られた化学物

質について蛋白質-リガンド複合体構造最適化プログラム Bluto を使用して、複合体に於ける構造最適化を行った。最後に蛋白質-リガンド複合体に於ける結合自由エネルギー解析プログラム GenB 並びに複合体形成に伴う脱溶媒和評価プログラム Desolv を用いて複合体安定化に寄与すると考えられる各種エネルギー項の計算を実行した。

4. 結合強度予測方法

logRBA の推算には平成 15 年度に構築・検証した以下の式を使用することにした。

$$\begin{aligned} \log\text{RBA}(\text{ER}\alpha) = & \\ & -1.668\text{GBelc} - 0.448\text{GBrep} - 0.229\text{GBcnf} - 0.148 \\ & \text{Desolv} - 4.749 \quad (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log\text{RBA}(\text{ER}\beta) = & \\ & -1.495\text{GBelc} - 0.401\text{GBrep} - 0.205\text{GBcnf} - 0.132 \\ & \text{Desolv} - 4.049 \quad (2) \end{aligned}$$

GBelc, GBrep, GBcnf, Desolv: 結合自由エネルギー計算で算出される各エネルギー項
GBelc : GenB で計算される分子間静電相互作用エネルギー
GBrep : GenB で計算される分子間立体相互作用エネルギー
GBcnf : GenB で計算されるリガンドの結合に伴う回転結合自由度の束縛効果
Desolv : Desolv で計算されるリガンド、蛋白質双方の複合体形成に伴う脱溶媒和

研究結果:

1. 低分子化合物の三次元化

まず、追加物質を中心とした 133 化合物の三次元構造への変換を行った。三次元化にはプログラム Key3D を使用した。力場パラメータ不足により対応できなかった 1 化合物 (perchlorate) を除く 132 化合物について、高

精度な三次元構造を得ることができた。次に、米国 EPA が環境ホルモン物質スクリーニング候補化合物として提示している 58,591 化学物質のうち、正確な構造式が入手できた 19,667 化学物質の三次元構造への変換を Key3D により行なった。力場パラメータ不足等により三次元化できなかった化合物が 74 化合物あった。これらのほとんどは無機化合物であった。ラジカルや金属イオン等の計算に適さない原子を含む分子、並びに 1 分子あたりの構成原子数が 200 原子より多い分子等を変換時に除外し、最終的に 17,744 化学物質について原子電荷などの付加情報を含む精度の高い三次元構造が得られた。

2. 追加物質等の ER α 及び ER β との結合様式の探索

追加物質を中心とした化合物群について、プログラム ADAM を用いて ER α 及び ER β とのドッキング計算を行った。受容体とリガンド間のマッチングの足がかりに利用する水素結合可能な原子(酸素、窒素)や芳香族環をまったく含まないため計算実行困難な化学物質が 2 分子含まれていたが、これらは計算の対象外とした。残りの 130 分子について結合様式探索を実行した結果、ER α に対しては 124 化合物、ER β に対しては 125 化合物について、複合体構造モデルが得られた。

3. EPA 化合物と ER α との結合様式の探索

EPA 化合物群と ER α とのドッキング計算を、プログラム ADAM を用いて行なった。受容体とリガンド間のマッチングの足がかりに利用する水素結合可能な原子(酸素、窒素)や芳香族環をまったく含まないもしくは 1 分子中の回転可能結合数が規定以上である等の理由により計算実行困難な化学物質が 2,198 分子含まれていたがこれらは計算の対象外とした。残りの

15,546 分子について結合様式探索を実行した結果、15,256 の化学物質について ER α との複合体構造が得られた。

4. 結合強度の予測

ADAM で用いるエネルギー値は格子点を利用して概算されている。そこでプログラム Bluto により、ADAM で得られたすべての複合体構造それぞれについて、リガンド結合キャビティを構成しているすべてのアミノ酸残基と各リガンドとを対象とした複合体でのエネルギー極小化計算を実行した。ついでプログラム GenB, Desolv によるエネルギー解析によって得られた各エネルギー項をもとに、ER α に対する結合強度は式(1)により、ER β に対する結合強度は式(2)により、それぞれ予測した。追加物質等について予測された結合強度は、ER α については表 1 に、ER β については表 2 にそれぞれ示した。EPA 化合物の ER α に対する予測結合強度は、上位 1000 化合物について表 3 にまとめた。

(2) 核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発
(分担研究者:小野 敦 医薬基盤研究所・基盤研究部)

研究目的: 本研究では、受容体作用物質が標的分子であるホルモン受容体との結合により他の生体分子との相互作用を変化させることに着目し、種々の分子と受容体相互作用の変化を SPR バイオセンサーやマススペクトル等を用いて解析する手法を構築し、その変化と生体作用との関連について検討を目的としている。またさらに、受容体作用物質の組織特異性や種差について解析する手法を構築するため、受容体作用物質が影響を及ぼす可能性のある組織や細胞に於ける構成要素からなる擬似生体系を *in vitro* に構築し、標的分子(ホルモン受容体)と生体分子との特異的な相互

作用の変化について解析を行い、その結果のスクリーニング系への応用を目指している。本年度は、これまで開発を進めてきた活性型 ER を特異的に認識する TIF2 ペプチドを用いた SPR スクリーニング法の拡張として、新たにアポ型 ER 認識ペプチドと ER との相互作用解析を組み合わせることで化合物の受容体作用についてこれまでと異なる観点から解析し、化合物をクラス分類する手法について他のスクリーニング系などで ER 受容体への作用が検出されている化合物について実際にスクリーニングを行い、検討を行った。また、新規の相互作用分子探索のための検討を行った。

研究方法:

1. ERE 固定センサーチップの作成

ERE オリゴヌクレオチドは、アダプター法にてセンサーチップに固定化した:すなわちストレプトアビジンをあらかじめコーティングしたセンサーチップを用い、ビオチン化アダプター1本鎖オリゴヌクレオチドを固定化し、アダプター相補配列を突出末端として付加した ERE を含む2本鎖オリゴヌクレオチドをインジェクトしてハイブリダイゼーションによりセンサーチップ上に固定化した。プローブの交換には、50mM NaOH でアダプターオリゴを1本鎖化して再び ERE オリゴを flow して固定化した。

2. ペプチド固定化センサーチップの作成

N 末端をビオチン化したペプチドを合成し、測定用バッファーに希釈してストレプトアビジンセンサーチップにインジェクトして固定化して測定に用いた。ER-コファクター相互作用を検討するにあたっては、ER による遺伝子発現においてコファクターとして機能することが示されている TIF2 の ER 結合サイト(LxxLL モチーフ)をコードするオリゴペプチドを合成して用いた。TIF2 は 3 つの LxxLL モチーフを有するが、実験では第 2 モチーフを用いた。また、アポ型受容体を認識するペプチドとしては、文献情報をもとに合成した数種のシークエンスについて検討し、最適な結合の得られた apo1 ペプチドを測定に用いた。

3. 相互作用の測定

ER は、リコンビナント Human ER α 及び β を使用した。ER を測定用バッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8、150mM KCl、0.5mM MgCl₂、0.05% Tween 20%, BSA 5 μ g/ml、TCEP 5nM)で希釈して、対象化合物と混合し、30°C で 5 分間インキュベートした後、サンプルを ERE 及び LxxLL を固定化したセンサーチップにインジェクトして SPR 装置(Biacore 3000, BiacoreAB) を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。化合物の結合による相互作用への影響を解析するにあたっては、化合物を 10⁻⁵~10⁻⁸M の濃度範囲で 10nM ER と混合し、ER の ERE 及び LxxLL ペプチドに対する結合解離過程を測定した。

4. 解析

各化合物の存在下及び非存在に於ける ER-ERE 相互作用の結合解離過程をそれぞれ 2 分間測定してそのレスポンスの変化を比較した。また、2 分間のレスポンスの増加を、結合量として求めた。解析には市販のコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)及び JMP ver.3(SAS institute))を用いた。

5. 新規相互作用分子探索に関する検討

新たに、核内受容体と特異的な相互作用する分子の探索のため、これまでに、ER を始めとした核内受容体との相互作用が報告されている分子の相互作用部位のアミノ酸配列を有するペプチドを合成して ER α ・ β との相互作用について検討を行った。さらに、これまで相互作用が報告されていない分子についても、核内受容体と相互作用に関与すると思われるアミノ酸配列部位を有するタンパク質を NCBI データベースより blast サーチにより検索した。得られたアミノ酸配列と、これまでの研究結果から相互作用する可能性が高いペプチドを合成し、同様に ER α ・ β との相互作用について検討を行った。

研究結果:

1. アポ型受容体相互作用ペプチドと ER 相互作用からの受容体作用の検討

アポ型受容体相互作用ペプチドと受容体相互特性について検討したところ E2 濃度依存的

に、apo1との相互作用は低下した。ER β でも、同様の傾向を示した。ER α とER β で活性に差のあるゲニスタインを用いて、TIF2とapo1との相互作用の解析を行ったところ、apo1相互作用の結果を用いることで、全ての受容体分子がリガンド分子と結合する濃度の検出が可能となり、同じ濃度下でのTIF2相互作用の結果から、共存する化合物のER活性化度の違いを比較可能であることが示された。次にアンタゴニストである4OH-タモキシフェン及び弱いアゴニストであるHPTEについて解析を行ったところ、ER-apo1相互作用はいずれにおいても濃度依存的低下を示し、このときER-TIF2相互作用の結果から化合物結合がERに及ぼす影響を分別可能であることが示された。

2. アポ型受容体相互作用ペプチドを用いた拡張 SPR 系における化合物スクリーニングに関する検討

活性型ER結合ペプチド(TIF2)と非活性型ER認識ペプチド(apo1)を用いた拡張SPRスクリーニング系としての有用性について検討した結果、両者の変化の方向性から、アゴニスト型、アンタゴニスト型、及びその中間の性質を有する化合物の区分が可能であることが示された。

3. 特異的相互作用分子探索に関する検討

受容体作用解析に有用な相互作用分子の探索のため10種のペプチドのペプチドを合成し、ER α 及びER β について代表的な各種リガンドとの共存下での結合活性について検討した結果、PGC-1由来のLxxLLペプチドは、ER β とアゴニスト存在下でERサブタイプ特異的な相互作用を示した。

(3) 受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究(分担研究者: 小原有弘(医薬基盤研究所・生物資源研究部))

研究目的: 培養細胞を用いた高速分析系は各国で開発が進められており、様々な細胞が用いられている。エストロゲン受容体を始めとする核内受容体のリガンドは非常にリダダンに他の受容体に作用することが明らかになっ

ており、このため用いた細胞によってその応答性が大きく異なることもあり、結果の比較評価を困難にしている。この多様性は国際的バリデーションの際には統一性の問題となるものの、科学的には個体差や臓器特異性の関連情報源と成り得る。本研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を中心に、今までに行われていないところの個々の細胞株に於けるターゲット分子を含む各種の核内受容体や関連する転写制御因子の発現に関しての網羅的、詳細な比較検討を行い、感受性差と関連分子の発現との解析より化学物質の作用特異性、個体差や臓器特異性の情報源としての有効性を検討する。

研究方法:

<細胞に関して>

MCF-7(乳癌):エストロゲン受容体陽性細胞として広く内分泌かく乱化学物質のスクリーニングに使用されている細胞。

培地: Eagle's minimal essential medium with NEAA, 1.5g/l NaHCO₃, 1mM pyruvate and 0.01mg/ml insulin with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

NEC14(精巣):ヒト精巣テラトカルチノーマ由来の細胞種であり、HMBA (N,N'-Hexamethylene-bis-acetamide)処理により、分化時に特徴的な形態変化・増殖活性の減少を起こすことが知られている細胞。

培地: RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HEC-1-A(子宮内膜):世界初の子宮体癌株であり、71歳女性の子宮体癌より樹立された。

エストロゲン受容体を発現していることが確認されている。

培地:EMEM with 15% heat inactivated fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

SKG-II (子宮内膜):子宮頸部類上皮腫、大細胞非角化型の細胞株であり、黄体ホルモン療法に関する研究に使用されている。

培地:Ham's F-12 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HepG2 (肝臓):毒性の分野で広く用いられているヒト肝癌由来細胞株であり、ダイオキシンに対する受容体発現が確認されている。

培地:Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

KMRC-3 (腎臓):腎明細胞がん由来細胞株。

培地:Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

UE6E7T-3 (骨髄由来間葉系幹細胞):骨髄由来間葉系幹細胞にヒトパピローマウイルス遺伝子 E6,E7 ならびにヒテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞株。脂肪、神経、骨への分化能を有しており、再生医療研究に広く利用されている。分化には化学物質の影響も少なく、DMSO の添加により分化することが確認されている。

培地:Ham's F-12 medium with 10% fetal calf

serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

OVKATE (卵巣):卵巣の漿液性乳頭状腺がん由来細胞株。

培地:RPMI1640 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.05% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

8505C (甲状腺):ヒト甲状腺未分化癌由来細胞株。p53 に変異が認められている。

培地:Eagle's minimal essential medium with 10% fetal calf serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

SW-13 (副腎皮質):ヒト副腎皮質癌由来細胞株。アドレノメデュリンが発現しており、ACTH、アンギオテンシン II、デキサメサゾンやサイトカインとの関連性に関して研究が行われている。

培地:Leibovitz's L-15 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

以上10株に関して、フェノーールレッド不含培地を用いて培養を行い、倍加時間を算出するとともに、最終継代から 24 時間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種して RNA 抽出を行った。

<RNA 抽出に関して>

RNA 抽出に関しては、キアゲン社製の RNeasyMini キットを使用して RNA 抽出した。

<リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解

析に関して>

リアルタイム RT-PCR には Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムならびに Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを使用し、TaqMan プローブにて解析を行った。TaqMan プローブは TaqMan® Gene Expression Assays Inventoried プロダクトより選択して検討を行った。

研究結果:

本研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を中心に選択し、その細胞での核内受容体ならびに関連分子に関する網羅的遺伝子発現解析を目的とした。本検討で使用した細胞はフェノールレッド不含培地で行い、最終継代から 24 時間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種して RNA 抽出を行った。今回用いた細胞の倍加時間はそれぞれ、MCF-7(乳癌)58 時間、NEC14(精巣)62 時間、HEC-1-A(子宮内膜)72 時間、SKG-II(子宮内膜)47 時間、HepG2(肝臓)32 時間、KMRC-3(腎臓)14 日、UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞)58 時間、OVKATE(卵巣)18 日、8505C(甲状腺)43 時間、SW-13(副腎皮質)74 時間、であった。細胞培養に際しては形態学的特徴を細胞の情報として記録するために動画撮影を行い、細胞増殖の過程を撮影した。

遺伝子発現解析を行う遺伝子に関しては核内受容体ならびにその関連分子を選択することとした。アプライドバイオシステムズ社で既に設計されている TaqMan® プローブである TaqMan® Gene Expression Assays Inventoried プロダクトより、核内受容体ならびにその関連分子に関して検索抽出したところ、598 種類(598 遺伝子ではない)のプローブが選択された。選択されたプローブの中には 47 種の核内受容体が含まれており、ほぼ核内受容体を網

羅できる(この他ホルモンレセプター、サイトカインレセプターなども含む)。まずは HeLa 細胞の RNA を利用してこれらプローブの測定感度を検討したところ、約 7 割のプローブ(34 種の受容体)で発現を検出できることがわかった。現在、受容体 47 種を含む TaqMan® Low Density Array を作成中であり、細胞ごとに順次遺伝子発現を定量していく予定である。

アレイのデザインは Format 384 とし、ターゲット遺伝子 380 種類 + 内源性コントロール遺伝子 1 種類。cDNA サンプル数:1 種類の場合、1 遺伝子あたりの反復(レプリケート)数: n=1(P/N 4342265)を採用した。

(4)核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究(分担研究者:板井 昭子 株)医薬分子設計研究所)

研究目的:

内分泌かく乱作用をもつ可能性のある化合物の毒性予測を行うため、DNA アレイ技術と、Percellome method による標準化法及び KeyMolnet によるネットワーク解析を組み合わせ、毒性予測のための方法論を開発する。

研究方法:

1. ネットワーク解析におけるデータ処理

解析には、3 種の合成ホルモン ethynyl estradiol(E2), testosterone propionate (TESTO), levothyroxine(T4) を経口投与したマウスの肝臓から RNA を抽出し、Affymetrix mouse 430A-2 により得た遺伝子発現データを用いた。遺伝子発現データは Percellome method により標準化した値を用い、さらに対数変換した後、 $p < 0.05$ を有意なデータとして採用した。各時系列に於いて、D0 をコントロール群として、各データセットのプローブに対する遺伝子発現量比(fold change)を算出し解析に用

いた(数値データ)。

2. E2, TESTO, T4 と結合する核内リセプターによるカノニカルな転写制御の関係における遺伝子発現の観察

3 種の合成ホルモンが結合する核内レセプターにより制御されることが報告されている遺伝子の発現を異なる時系列、用量に対して観察した。上記核内レセプターとその分子種をすべて端点(ER, ERa, ERb, ERR, ERRa, ERRb, ERRg, TR, TRa, TRa1, TRa2, TRb1, TRb2, DHTR)として、これらに制御されることが報告されている分子のネットワークを検索し、各データセットに於ける数値データをマッピングした。

3. 実験条件の絞り込み

以降のネットワーク解析に適した条件を選定するため、各条件に於いて、コントロールに比べて 2 倍以上有意に発現亢進及び低下した分子の数と時系列、用量の関係を検索した。

4. 各ホルモン作用に対する up-regulate または down-regulate するネットワークの生成

3 で選定した条件に於いて、各データセットでコントロールに比べて 2 倍以上有意に発現亢進または低下した分子を KeyMolnet 上で抽出し、周辺検索法によりネットワークを生成した。同一化合物に対する別条件で生成したネットワークは AND 論理演算法を用い、複数ネットワークの共通部分を抽出し、各化合物作用により“up-regulate または down-regulate するネットワーク”とした。

5. 各化合物特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークの抽出

4 で抽出した 3 種類の化合物に対する

up-regulate または down-regulate するネットワークに、DIFF 論理演算法を用いて、差分ネットワークを抽出し、各化合物特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークを構築した。

研究結果:

1. E2, TESTO, T4 と結合する核内リセプターによるカノニカルな転写制御の関係における遺伝子発現の観察

ER, ERa, ERb, ERR, ERRa, ERRb, ERRg, TR, TRa, TRa1, TRa2, TRb1, TRb2, DHTR のすべてを端点として、これらに制御されることが報告されている分子をネットワーク検索し、各データセットに於ける数値データをマッピングすると、どの条件に於いても各核内リセプターに直接制御されることが報告されている分子の発現量は顕著には変化していなかった。このため、各化合物作用に対して、遺伝子発現量の有意な変化を示す分子(上記核内リセプターと直接的な関係が報告されている分子に限らない)によるネットワーク生成が必要と考えた。

2. 実験条件の絞り込み

以降に行うネットワーク解析に於いて、適当かつ有効な時系列、用量の実験条件を絞り込むため、各データセットに於いてコントロールに比べて 2 倍以上有意に発現亢進または低下している分子数と時系列、用量の関係を調べたところ、3 種類の化合物の作用に於いては、発現量の変化が認められた 9 点のデータセットを以下の解析に用いた。

3. E2, TESTO, T4 特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークの抽出

生成、抽出したネットワークは E2, TESTO 特異的に up-regulate したネットワーク、E2,

TESTO, T4 特異的に down-regulate したネットワークである。up-regulate したネットワークについては T4 によるネットワークは作成できなかったが、上記、全 5 種類のネットワークの canonical な“Pathway”及び Gene Ontology の関与度を、サマリーシート機能を用いて算出、表示した。

C. 結論

(1) 核内受容体作用物質)のハイスループット・スクリーニングの実施

Firefly Luciferase 遺伝子の上流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER alpha 又は ER beta を常時発現するための Plasmid が同時に一過性に導入された細胞を使用し、71 種類の化学物質についてその ER alpha 及び ER beta アゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、71 物質中アゴニスト活性を有する物質は、ER alpha のみについて 7 物質、ER beta のみにについて 1 物質であり、両者共にアゴニスト活性を有する物質は、8 物質であった。この 8 物質中では算出された PC10 もしくは PC50 に 5 倍以上濃度差のあるものを選択性の高い物質とした場合、ER alpha に選択性の高いものはなく、ER beta に選択性の高いものは 2 物質、選択性なく同等とみなされるものは 6 物質であった。

一方、ホタルルシフェラーゼをレポーターにした ARレポータージーンアッセイ及び TRレポータージーンアッセイは、それぞれの内在性リガンドである DHT や T3 等に対して十分感度よく応答することがこれまでの検討からも明らかになっている。今年度の検討では新たにそれぞれ 50 物質についてスクリーニングした結果、AR 及び TR 機能を攪乱する可能性のある物質 (アゴニスト、アンタゴニスト) の候補を選定することができた。以上のことから、この方法を用い

れば、AR 及び TR 攪乱物質の広範なスクリーニングが可能である。

我々の開発したドッキングモデルによる *in silico* スクリーニング法を利用して、ER α 及び ER β に対する多種化学物質の結合活性値予測を試みた。追加物質等に関しては ER α 、ER β いずれに対しても 9 割以上の化合物について結合様式と結合強度の予測を行なうことができた。米国 EPA が環境ホルモン物質スクリーニング候補化合物として提示している化学物質については、約 15,000 の物質について、ER α への結合強度を予測することが出来た。われわれの手法は化学物質の構造を選ぶことなく結合様式を推定でき、かつ結合強度が予測可能であるため非常に有用であると考えられる。

(2) 核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発

核内受容体作用物質の化合物特異的もしくは組織特異的な生体作用を検出・評価する系の構築のため、リガンド結合により受容体と相互作用する種々の分子との相互作用変化を SPR バイオセンサーやマスペクトル等を用いて解析する手法の検討を目的として、本年度は、これまでに構築した SPR バイオセンサーを用いた核内受容体相互解析系の拡張としてアポ型 ER 認識ペプチドと ER との相互作用解析を組み合わせることで化合物の受容体作用、ER のリガンド占有率、受容体活性化率を同時に定量化することでアゴニスト型、アンタゴニスト型、及びその中間の性質を有する化合物のこれまでより明確な区分が可能であることが示された。また、新たな特異的相互作用分子の探索により PPAR γ のコファクターとして知られる PGC-1 が ER β 特異的に相互作用することが明らかとなった。今後、さらに多くの特異的相互作用分子相互作用を統合的に解析する

系を構築することで、より詳細なメカニズムに即した化合物スクリーニングが可能になり、個々の化合物についてより多面的に内分泌かく乱作用を検討可能になると結論づけられた。

(3) 受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究

核内受容体や関連する転写制御因子の発現に関しての網羅的に詳細な比較検討を行うため、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を10種(MCF-7(乳癌), NEC14(精巣), HEC-1-A(子宮内膜), SKG-II(子宮内膜) HepG2(肝臓), KMRC-3(腎臓), UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞), OVKATE(卵巣), 8505C(甲状腺), SW-13(副腎皮質))選択した。形態観察記録として動画記録を行い、細胞の増殖速度は遅いが、細胞が活発に活動している状況が確認できた。倍加時間に関しては今回選択した細胞の中に非常に長い倍加時間を示す細胞種もありスクリーニングに不向きであることがわかった。今回培養した細胞の RNA を用いて 47 種の核内受容体遺伝子の TaqManR プロブの感度確認を行い約 7 割の受容体に関して定量的な結果が得られることを確認した。また、47 種の核内受容体を含む 380 種の TaqManR プロブを用いて TaqManR Low Density Array を作製した。

(4) 核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究

化合物特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークが簡便かつ効率的に抽出できたことから、今後さらに他の化合物作用に対する特徴的なネットワークを蓄積することによってパターンニングし、内分泌かく乱の可能性のある化合物に対しても、マイクロアレイデータからネットワークが生成でき、その

ネットワークの類似性によって、毒性作用メカニズムの推定、毒性予測が行える可能性が示唆された。

D. 考察及び今後の展望

本研究では、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会、中間報告追補」に於いて提案された「試験スキーム」に沿って要求される内分泌かく乱化学物質大規模スクリーニングを実施するとともに、これまでの研究結果をもとに内分泌かく乱化学物質の標的分子である核内受容体作用について、化学物質と受容体、応答 DNA 配列及び転写に関わる共役因子との相互作用、さらには受容体制御下にある遺伝子発現への影響について解析を行い、得られた結果をこれまで開発を進めてきた細胞系スクリーニング法や *in silico* 手法へフィードバックし、分子標的作用メカニズムに基づく見落としのないスクリーニング系とするとともに、科学的により高度なメカニズム解析による次世代評価系への応用を目的としている。

内分泌かく乱化学物質大規模スクリーニングの実施に於いて本年度は、内分泌かく乱性を評価するためのプレスクリーニング試験としてのレポーター遺伝子活性化試験の有用性を検討するためヒト ER alpha 及び ER beta を介するアゴニスト活性について既存の化学物質 71 物質について検討を行った結果、71 物質中アゴニスト活性を有する物質は、ER alpha のみにについて 7 物質、ER beta のみにについて 1 物質であり、両者共にアゴニスト活性を有する物質は、8 物質であった。この 8 物質中では算出された PC10 もしくは PC50 に 5 倍以上濃度差のあるものを選択性の高い物質とした場合、ER alpha に選択性の高いものはなく、ER beta に選択性の高いものは 2 物質、選択性なく同等とみなされるものは 6 物質であった。一方、